



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

임신초기 hCG가 유선조직에 미치는  
영향에 대한 연구

Studies of hCG on mammary gland at early pregnancy

2019년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

이원빈

# 임신초기 hCG가 유선조직에 미치는 영향에 대한 연구

Studies of hCG on mammary gland at early pregnancy

지도교수 공영윤

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2019년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

이원빈

이원빈의 석사 학위논문을 인준함

2019년 8월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 김진홍 (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ 공영윤 (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 강찬희 (인)

# I . 국문초록(Abstract in Korean)

## 임신초기 hCG가 유선조직에 미치는 영향에 대한 연구

이원빈

생명과학부

서울대학교 대학원 자연과학대학

유선조직(Mammary gland)은 형태, 기능적으로 불완전한 상태로 태어나며 사춘기 이후 본격적인 발달이 일어난다. 유선조직은 지방체(Fat pad)에 둘러싸여 있으며 유두에 직접적으로 연결된 본가지(Primary duct)와 본가지로부터 뻗어 나온 곁가지(Side branch)가 존재한다. 곁가지는 본가지로부터 뻗어 나오며 이곳에서 유즙(Milk)을 분비하는 유관소엽(lobulo-alveolar)이 만들어진다고 알려져 있다. 임신초기에 곁가지 수가 증가하여 유관소엽이 만들어질 공간을 넓힌다. 임신중기에 유관소엽이 만들어지고 임신말기에 유관소엽에 존재하는 선상피세포(Alveolar epithelial cell)가 분화하여 유즙을 분비한다고 알려져 있다. 본가지와 곁가지는 모두 유관(Duct)을 둘러싼 안쪽 층과 유관의 수축을 돕는 바깥쪽 두 층의 세포로 이루어져 있다. 유선조직의 모든 세포를 만들 수 있다고 알려진 유선줄기세포(Mammary Stem Cell)는 유선전구세포(Luminal progenitor cell)와 근 상피 전구세포(Myo-epithelial progenitor cell)로 분화하여 각각 안쪽 세포층에 존재하며 유관을 둘러싸고 있는 유선상피세포(Luminal epithelial cell)와 바깥쪽에 존재하며 유관의 수축을 돕는 근 상피세포(Myo-epithelial cell)로 분화한다고 알려져 있다. 유선전구세포(Luminal progenitor cell)는 곁가지에 존재하다가 임신을 하면 유관의 형태를 유지하는 유관상피세포(Ductal epithelial cell)와 유즙을 분비하는 선상피세포로 분화하여 곁가지와 유관소엽을 만든다. 출산이후 유즙 분비를 마치면 유즙 분비를 위해 많이 만들어진 성숙한 유선세포들이 세포사멸 과정을 거치면서 곁가지와 유관소엽이 없어진다.

다.

유즙은 모체보다는 태아의 생존에 필요하다. 이렇게 모체보다는 태아의 생존을 위한 유즙을 분비하는 시기에만 활발히 분열, 분화하여 기능을 하는 유선전구세포는 배아유래물질에 영향을 받아 분화할 것이라 예상되지만 기존 연구는 E1f5, Gata-3, Stat5 등 모체유래물질에 국한되어 있다. 본 논문에서는 임신초기 유선전구세포가 분화하는 시기를 특정하고 이 시기에 배아에서 나온다고 알려진 hCG가 유선전구세포의 분화를 유도하고 결가지 형성을 유도한다는 것을 밝혔다. hCG는 유선조직의 발달에 관여한다고 알려져 있지만 hCG에 의해 발현이 증가하는 성호르몬 또한 유선조직의 발달에 관여한다고 알려져 있다. 본 논문에서는 난소를 적출하여 성호르몬을 제한한 마우스모델을 이용하여 hCG와 성호르몬이 함께 작용해야 유선전구세포의 분화를 유도할 수 있다는 것을 밝혔다.

핵심어: 유선전구세포, hCG, 성호르몬, 결가지, 임신

학번: 2016-29780

## II. 목 차(Table of Contents)

|  | Page |
|--|------|
| I. 국문초록(Abstract in Korean) -----                | 1    |
| II. 목차(Table of Contents) -----                  | 3    |
| III. 서문(Introduction) -----                      | 4    |
| IV. 실험재료 및 방법(Materials and Methods) -----       | 6    |
| IV-1. 마우스(Mice) -----                            | 6    |
| IV-2. 유세포 분석(Flow Cytometry) -----               | 6    |
| IV-3. 온조직 염색(Whole Mount Staining) -----         | 7    |
| IV-4. hCG 주사(hCG Injection) -----                | 8    |
| IV-5. 난소적출(Ovariectomy) -----                    | 8    |
| IV-6. 호르몬 튜브 삽입(Hormone Tube Implantation) ----- | 8    |
| IV-7. 통계처리(Statistical Analysis) -----           | 8    |
| V. 결과(Results) -----                             | 10   |
| V-1. 임신초기 유선전구세포가 분화한다. -----                    | 10   |
| V-2. 임신초기 hCG에 의하여 유선전구세포가 분화한다. -----           | 13   |
| V-3. hCG는 성호르몬에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다. ---     | 16   |
| V-4. 성호르몬은 hCG에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다. ---     | 19   |
| V-5. hCG와 성호르몬이 함께 작용해 유선전구세포의 분화를 유도한다. ----    | 22   |
| VI. 고찰(Discussion) -----                         | 25   |
| VII. 참고문헌(References) -----                      | 26   |
| VIII. 영문초록(Abstract in English) -----            | 29   |

### Ⅲ. 서문(Introduction)

유선조직(Mammary gland)은 다른 조직과는 다르게 태어날 때 거의 발달되지 않은 상태로 태어나고 사춘기 무렵 성 호르몬의 영향을 받아 본격적인 발달이 이루어진다(Cathrin Briskin, 2013). 유선조직은 지방체(Fat pad)에 둘러싸여 있으며 유두에 직접적으로 연결된 여러 개의 굵은 본가지(Primary duct)와 곁가지(Side branch)로 이루어진 가지 모양으로 이루어져 있다(Cathrin Briskin, 2013). 본가지의 끝은 성호르몬인 에스트로겐의 영향을 받아 활발히 분열하여 본가지의 길이를 연장하며 싹 모양처럼 생겼다고 해서 이를 말단 싹(Terminal end bud)이라고 한다(Paine, I. S., 2017). 본가지는 말단 싹이 두 개로 나뉘는 방법으로 그 수가 늘어난다(Scheele et al., 2017). 곁가지는 프로게스테론의 영향을 받아 본가지 또는 또 다른 곁가지로부터 뻗어 나온다(Cathrin Briskin, 2002).

본가지와 곁가지는 모두 유관(Duct)을 둘러싼 두 층의 세포로 이루어져있는데 안쪽에 있는 세포를 유선상피세포(Luminal epithelial cell)라고 하고 바깥쪽에 존재하며 유관의 수축을 돕는 세포를 근 상피세포라(Myo-epithelial cell)고 한다(Malgorzata Gajewska et al., 2013). 유선상피세포는 유관의 구조를 유지하는 유관상피세포(Ductal epithelial cell)와 유즙을 분비하는 선상피세포(Alveolar epithelial cell)로 이루어져있다(Malgorzata Gajewska et al., 2013). 유선조직의 모든 세포를 만들 수 있다고 알려진 유선줄기세포(MaSC. Mammary Stem Cell)는 바깥쪽 세포층에 존재하다가 이분화전구세포(Bi-potent progenitor cell)로 분화한 뒤 유선전구세포(Luminal progenitor cell)와 근 상피전구세포(Myo-epithelial progenitor cell)로 분화한다(Jane E. Visvader & Jone Stingl, 2014, Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007). 유선전구세포는 성숙한 유선상피세포인 유관상피세포와 선상피세포로 분화하고 근 상피전구세포는 근 상피세포로 분화하여 유선조직을 유지한다(Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007).

유선조직은 태아의 영양을 보충하기 위한 조직으로 임신을 하면 급격한 발달이 일어난다(Jane E. Visvader & Jone Stingl, 2014). 임신초기에 곁가지가 많이 만들어져 유즙을 생성하는 유관소엽이 형성될 공간을 확보하고 임신중기에 곁가지로부터

터 유관소엽이 형성된다(Cathrin Briskin, 2013). 이 때 CD61+ 유선전구세포가 Gata3, Elf에 의하여 결가지의 성숙한 CD61- 유관세포와 유관소엽의 성숙한 CD61- 선상피세포로 분화한다고 알려져 있다(Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007, Chakrabarti R., 2012). 임신후기에 유관소엽에 존재하는 선상피세포가 유즙을 분비하고 근 상피세포가 수축해 유두로 유즙을 이동시킨다(Cathrin Briskin, 2013). 출산이후 유즙 분비를 마치면 유즙 분비를 위해 많이 만들어진 성숙한 유선세포들이 세포사멸 과정을 거치면서 결가지와 유관소엽이 없어진다(Cathrin Briskin, 2013).

유선조직의 형태학적 발달에는 성호르몬, Wnt, Notch, RankL와 같이 많은 모체 유래물질이 관여한다고 알려져 있다(Cathrin Briskin & Bert O'Malley, 2010, Russo IH. et al., 1990, Aino Kuorelahti et al., 2007). 유선전구세포의 분화에는 Gata-3, Elf5와 같이 모체유래물질이 관여한다고 알려져 있지만 배아유래물질이 유선전구세포의 분화에 관여한다는 선행 연구결과는 없다(Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007, Daisuke Yamaji et al., 2009).

본 논문은 배아유래물질인 hCG가 유선전구세포의 분화를 유도하여 유선조직의 형태학적 변화를 유도할 수 있음을 밝히고 나아가 난소를 적출하여 배아유래 hCG와 성호르몬을 제한한 마우스 모델을 통해 성호르몬과 hCG가 어떻게 작용하여 유선전구세포의 분화와 유선조직의 형태학적 발달에 영향을 주는지 알아보고자 한다.



## IV. 실험재료 및 방법(Materials and Methods)

### IV-1. 마우스(Mice)

12주에서 20주령사이의 성체 FVB/N 마우스를 실험에 사용하였다. 모든 마우스는 서울대학교 자연과학대학 SPF 동물실에서 사육되었다.

### IV-2. 유세포 분석(Flow Cytometry)

유세포 분석에는 유선조직이 있는 모든 지방체를 사용하였다. 마우스에서 얻은 지방체를 1mm x 1mm x 1mm 미만의 크기로 잘게 자른 후 5% FBS (Fetal Bovine Serum, cat. no. 30396.03, Gibco), 10ng/ml EGF (cat. no. PMG8043, Invitrogen), 10ng/ml bFGF (cat. no. F0291, Sigma Aldrich), 0.0004% Heparin (cat. no. 07980, STEMCELL Technologies), 800U/ml Collagenase type II (cat. no. LS004177, Worthington)가 포함된 epicult-B basal media (cat. no. 05610, STEMCELL Technologies)를 샘플 당 4ml을 넣고 37℃가 유지된 회전기 안에서 1시간 30분 배양한다. 원심분리기를 이용해 세포들을 침전시키고(300g, 5분, 4℃) 상층액을 버린다. 침전된 세포를 잘 풀어준 후 RBC lysis buffer (150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM Tris-HCl)와 FACS buffer (2% FBS in PBS)를 4:1 비율로 넣고 실온에서 5분간 흔들어준다. 원심분리기를 이용해 세포들을 침전시키고(380g, 5분, 4℃) 상층액을 버린다. 침전된 세포를 잘 풀어준 후 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (cat. no. 15400, Gibco)를 1ml 넣고 파이펫을 이용해 3분간 잘 섞어준다. FACS buffer를 4ml 넣어 중화시켜준 후 원심분리기를 이용해 세포들을 침전시키고(380g, 5분, 4℃) 상층액을 버린다. 침전된 세포를 잘 풀어준 후 5mg/ml dispase (cat. no. 07913, STEMCELL Technologies)와 DNase I (cat. no. 07900, STEMCELL Technologies)를 각각 900 $\mu$ l, 100 $\mu$ l를 넣고 파이펫을 이용해 1분간 잘 섞어준다. FACS buffer를 4ml 넣어 중화시켜준 후 40- $\mu$ m cell strainer (cat. no.

93040, SPL)에 통과시켜 단일세포만 얻어낸다. 원심분리기를 이용해 세포들을 침전시키고(380g, 5분, 4℃) 상층액을 버린다. 침전된 세포를 잘 풀어준 후 일차 항체 anti-CD24-PE/Cy7 antibody (cat. no. 101821, BioLegend), anti-CD29-APC antibody (cat. no. 102215, BioLegend), anti-CD61-FITC antibody (cat. no. 104305, BioLegend), biotinylated anti-CD31 antibody (cat. no. 102404, BioLegend), biotinylated anti-CD45 antibody (cat. no. 103104, BioLegend), biotinylated anti-CD140b antibody (cat. no. 136010, BioLegend) and biotinylated anti-Ter119 antibody (cat. no. 116204; BioLegend)를 FACS buffer 50 $\mu$ l에 100ng씩 녹여 세포들과 잘 섞어준 후 40분간 얼음에서 반응시킨다. FACS buffer 1ml로 wash한 후 원심분리기를 이용해 세포들을 침전시키고(380g, 5분, 4℃) 상층액을 버린다. 침전된 세포를 잘 풀어준 후 이차항체인 streptavidin-PerCP antibody (cat. no. 405213, BioLegend)를 FACS buffer 50 $\mu$ l에 100ng 녹여 세포들과 잘 섞어준 후 20분간 얼음에서 반응시켜 biotin으로 표지된 세포가 형광을 띄게 한다. 원심분리기를 이용해 세포들을 침전시키고(380g, 5분, 4℃) 상층액을 버린다. 침전된 세포를 잘 풀어준 후 죽은 세포를 걸러내기 위해 , 7-aminoactinomycin D (cat. no. SML1633; Sigma Aldrich)가 1:1000으로 포함된 FACS buffer에 세포를 잘 섞고 FACS Canto II를 이용해 data를 얻었고 Flow Jo프로그램을 이용해 분석하였다.

#### IV-3. 온조직 염색(Whole Mount Staining)

온조직 염색에는 서혜부에 위치하고 있는 4번과 5번 지방체를 이용하였다. 마우스로부터 얻은 지방체를 슬라이드 글라스에 잘 퍼준 뒤 Clarke's solution (75% ethanol, 25% acetic anhydride)에 24시간동안 넣어둔다. 70% ethanol에 30분간 넣어 세척한 후 Carmine-alum solution (0.2% carmine, 0.5% aluminium potassium sulfate, 0.02% thymol)에 24시간 넣어둔다. 탈색을 위해 HCl이 2% 포함된 70% ethanol에 4시간 넣어둔다. 이후 조직을 70%, 95%, 100% ethanol에 1시간씩 넣어 순차적으로 dehydration하고 xylene에 24시간 넣어 조직을 투명화 한다. 조직은 methyl salicylate (cat. no. M6752-500ML, Sigma Aldrich)에 보관하고 Nikon

SMZ18 microscope와 Nikon DS-Ri2 camera를 이용하여 사진을 찍었다.

#### IV-4. hCG 주사(hCG Injection)

마우스를 보정한 뒤 복강내에 200IU/ml hCG (cat. no. CG10-1VL, Sigma Aldrich)를 250 $\mu$ l (25IU of hCG)주사하였다.

#### IV-5. 난소적출(Ovariectomy)

마우스 무게 g당 250 $\mu$ g의 2,2,2-tribromoethanol (Avertin, cat. no. T48402-25G, Sigma Aldrich)를 복강 내 주사하여 마취한 뒤 등을 절개하여 난소를 적출하고 봉합용 멸균사(cat. no. sk-717, 아이리)를 이용하여 수술한 부위를 꿰맨다.

#### IV-6. 호르몬 튜브 삽입(Hormone Tube Implantation)

Corn oil (cat. no. C8267-500ML, Sigma Aldrich)에 17 $\beta$ -estradiol (cat. no. E8875-1G, Sigma Aldrich)을 15 $\mu$ g/ml, progesterone (cat. no. P0130-25G, Sigma Aldrich)을 1mg/ml로 녹인다. Silastic tube (cat. no. 508-009, Dow Corning)를 2cm 길이로 자르고 그 안에 호르몬이 녹아있는 corn oil을 50 $\mu$ l 넣고 3mm 길이의 wooden cap으로 양쪽을 잘 막아준다. 마우스 무게 g당 250 $\mu$ g의 avertin을 복강 내 주사하여 마취한 뒤 목 뒤의 외피를 절개하고 등 쪽 피하에 호르몬이 들어있는 tube를 넣는다. 절개한 부위는 봉합용 멸균사를 이용해 꿰맨다.

#### IV-7. 통계처리(Statistical Analysis)

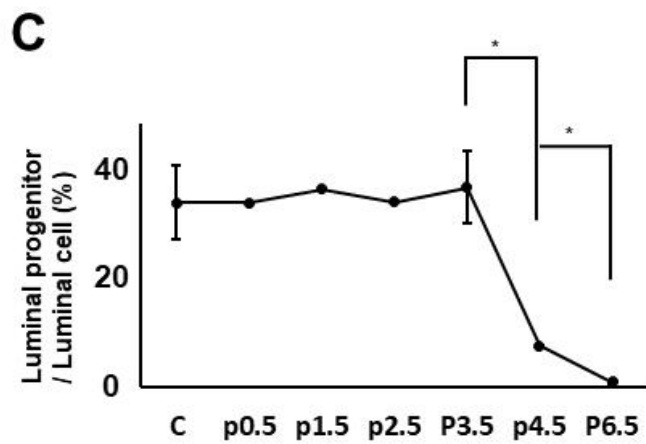
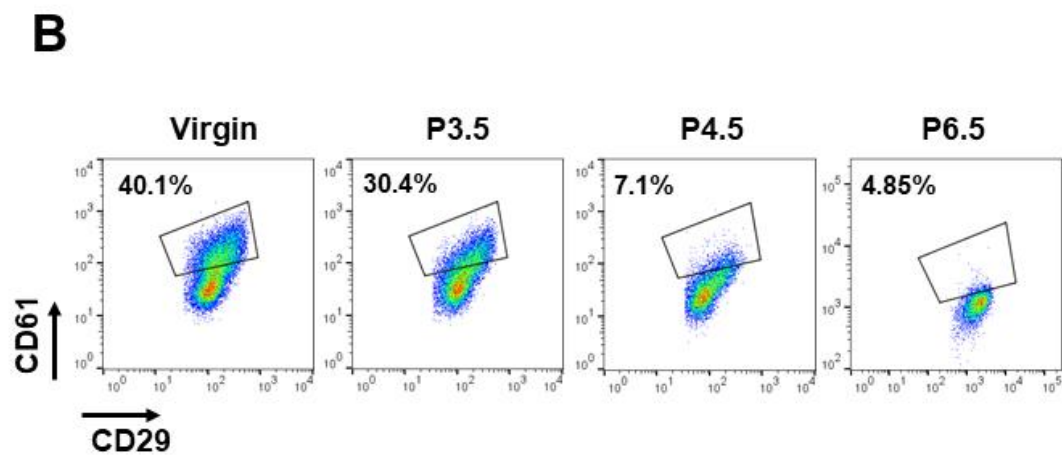
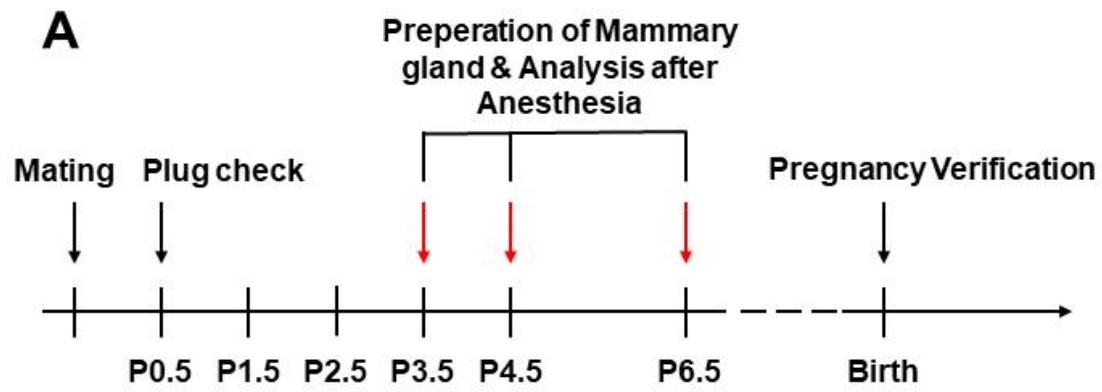
통계적 유의성은 student t-test로 확인하였다. Error bar는 표준오차(S.E.M)로 나타내었다. P-value가 0.05보다 낮은 경우 95%의 신뢰수준으로 유의성이 있다고 생각하고 \* 표시로 나타내었다.

## V. 결과(Results)

### V-1. 임신초기 유선전구세포가 분화한다.

선행연구에 따르면 임신 초기에 유선전구세포가 분화하여 곁가지가 많이 만들어지고 임신 중반이후 많아진 곁가지로부터 유관소엽이 형성된다고 알려져 있다 (Malgorzata Gajewska et al., 2013). 임신 시 CD61+ 유선전구세포가 성숙한 CD61- 유선상피세포로 분화하여 곁가지를 만든다고 알려져 있으며 이 때 Gata-3, Elf5가 작용한다고 알려져 있다 (Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007, Chakrabarti R. et al., 2012). 하지만 임신초반에 어떤 신호에 의하여 유선전구세포가 분화하는지는 보고된 바가 없다.

임신초기에 어떤 신호에 의하여 유선전구세포가 분화하는지 알아보기 위해 유선전구세포가 분화하는 정확한 시기를 아는 것이 중요하다. 유선전구세포가 분화하는 시기를 알아보기 위해 P3.5 (Pregnancy day 3.5), P4.5 P6.5의 유선조직의 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 분석했다 (Figure 1A, B). 임신초기 유선조직을 얻기 위해 암컷 처녀 마우스를 교배시킨 후 교배가 확인된 날을 P0.5로 계산하고 각각 P3.5, P4.5 P6.5에 마취 후 유선조직을 얻고 회복이후 출산여부로 임신을 확인하였다 (Figure 1A). 시기별로 얻은 유선조직으로 유세포 분석을 이용하여 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 분석한 결과 P3.5와 P4.5 사이, P4.5와 P6.5사이에 유선상피세포 내 CD61+인 유선전구세포의 비율이 줄어드는 것을 확인했다 (Figure 1B, C). CD61+ 유선전구세포의 비율이 줄어들고 성숙한 CD61- 유선상피세포의 비율이 늘어나는 것으로 보아 P3.5와 P4.5 사이, P4.5와 P6.5사이에 유선전구세포가 분화하는 것을 알 수 있었다.



**Figure 1. 임신초기 유선전구세포가 분화한다.**

(A) 임신초기 유선조직을 분석하기 위한 실험모식도이다. 처녀 마우스를 수컷 마우스와 교배시키고 교배가 확인된 날을 P0.5라고 생각하고 P3.5, P4.5, P6.5에 avertin으로 마취 후 유선조직을 얻었다. 회복기간 이후 출산여부로 임신을 확인하였다.

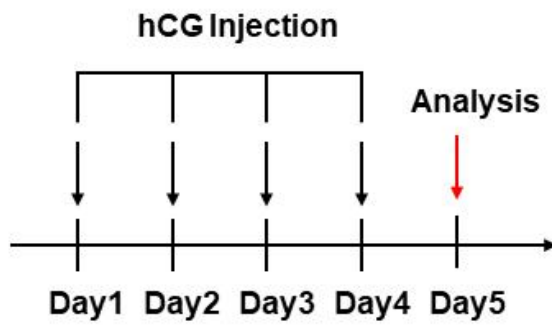
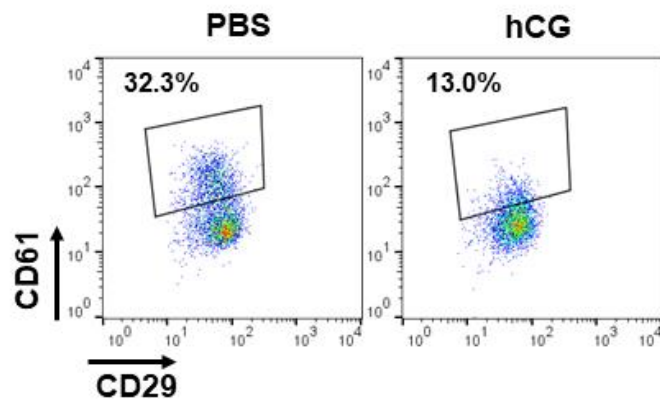
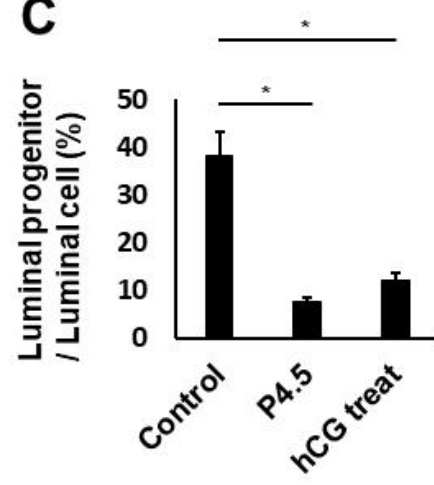
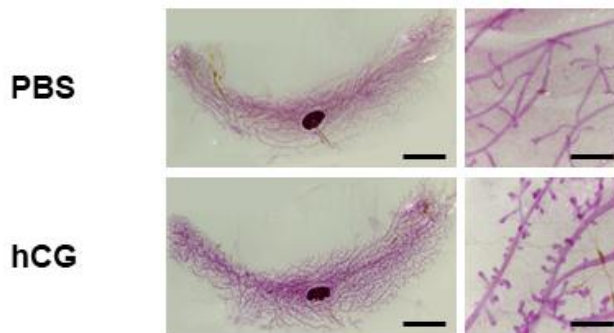
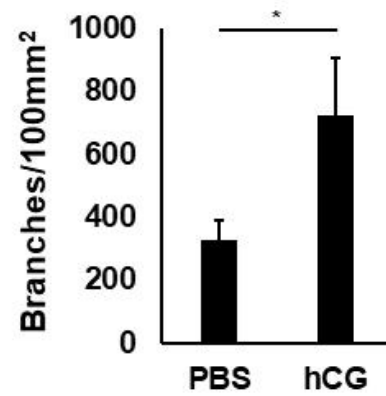
(B) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 유세포 분석을 한 결과이다. 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 표시하였다.

(C) (B)의 결과를 정량화한 그래프이다. P3.5와 P4.5사이, P4.5와 P6.5사이에 유선전구세포의 비율이 감소함을 확인하였다(\*:  $P\text{-value} < 0.05$ ).

## V-2. 임신초기 hCG에 의하여 유선전구세포가 분화한다.

V-1에서 유선전구세포가 P3.5와 P4.5사이, P4.5와 P6.5사이에 성숙한 유선세포로 분화하는 것을 확인했다. 이 시기에 임신한 마우스에서 가장 큰 변화는 착상 (P4.5) 이고 이때 배반포에서 hCG가 분비되어 착상을 돕는다고 알려져 있다 (Makrigiannakis A. et al., 2017, Haibin Wang & Sudhansu K. Dey, 2006). 또한 hCG를 과발현하는 처녀 마우스에서 유관소엽의 형태가 관찰된다고 알려져 있다 (Susana B. Rulli et al., 2002). 선행연구들과 V-1의 결과를 종합하여 임신초기의 hCG가 유선전구세포의 분화를 유도할 것이라는 가설을 세우고 실험을 진행하였다. 임신초기에 hCG가 유선전구세포의 분화를 일으켰는지 확인하기 위해 hCG를 25IU 씩 4일간 주사한 처녀 마우스와 PBS를 4일간 주사한 처녀 마우스의 유선상피세포를 유세포 분석을 통해 비교했다(Figure 2A, B). 그 결과 hCG를 주사한 마우스에서 임신초기 (P4.5)와 비슷하게 유선상피세포 내 CD61+ 유선전구세포의 비율이 줄어든 것을 확인했고 이로써 hCG를 주사하면 임신초반과 유사하게 유선전구세포가 분화한다는 것을 알 수 있었다(Figure 2B, C). 임신초기에 분화하는 유선전구세포는 결가지를 만든다고 알려져 있다(Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007). hCG를 주사하여 분화된 유선전구세포가 유선조직의 형태학적 변화를 일으켰는지 알아보기 위해 온조직 염색을 통해 유선조직을 관찰했다(Figure 2D). 그 결과 임신초기에 결가지가 많아지는 것과 유사하게 hCG를 주사한 경우에도 결가지가 많아지는 것을 확인했다(Figure 2D, E). 결과를 종합해보면 hCG를 처녀 마우스에 주사함으로써 임신초기 마우스의 유선전구세포가 분화하며 결가지가 만들어지는 변화를 모방할 수 있다는 결론을 낼 수 있다.



**A****B****C****D****E**

**Figure 2. 임신초기 hCG에 의하여 유선전구세포가 분화한다.**

(A) hCG주사 후 유선조직을 비교하기 위한 실험모식도이다. 성체 처녀 마우스의 복강에 hCG를 25IU씩 또는 PBS를 250 $\mu$ l씩 4일간 주사한 후 5일째 되는 날 분석하였다.

(B) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 유세포 분석을 한 결과이다. 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 표시하였다.

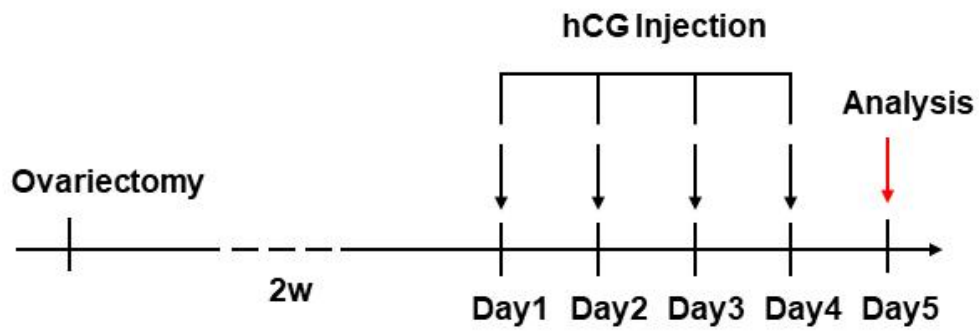
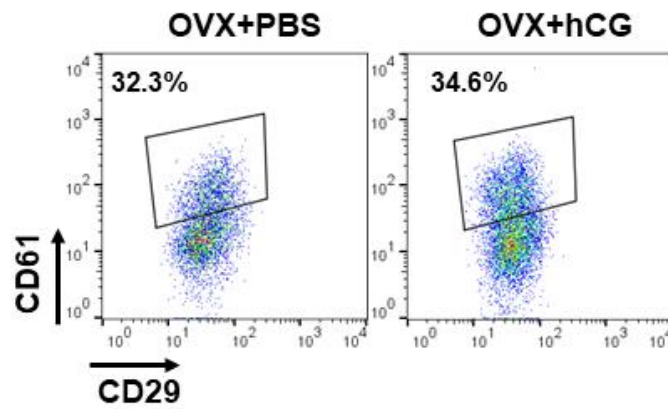
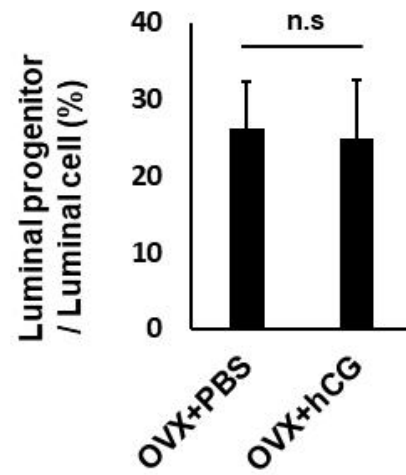
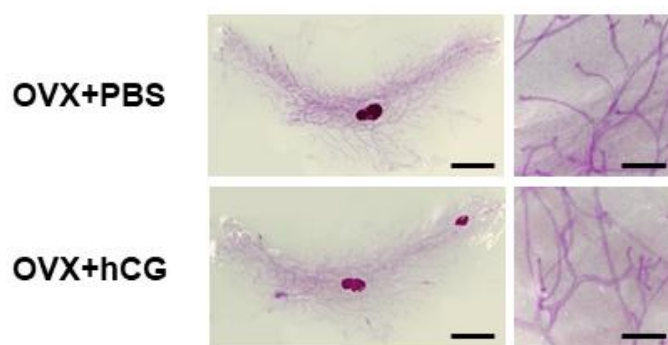
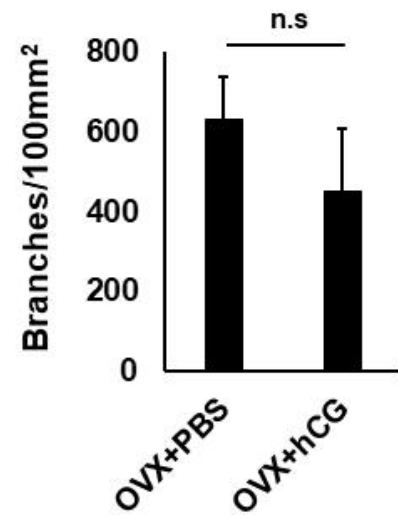
(C) (B)의 결과를 정량화한 그래프이다. P4.5에 유선전구세포의 비율이 줄어드는 것과 유사하게 hCG를 주사한 경우 유선전구세포의 비율이 줄어들었다(\*: P-value<0.05).

(D) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 온조직 염색을 한 결과이다(Scale bar - 왼쪽: 5000 $\mu$ m, 오른쪽: 500 $\mu$ m).

(E) (D)에서 지방체 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수를 세어 그래프로 나타내었다. hCG를 주사한 경우 PBS를 주사한 경우와 비교하여 유선조직 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수가 늘어났다(\*: P-value<0.05).

### V-3. hCG는 성호르몬에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다.

V-2에서 hCG에 의하여 처녀 마우스의 유선전구세포가 임신초기와 비슷하게 분화하는 것과 결가지가 많아지는 것을 확인했다. hCG는 황체(Corpus lutein)의 퇴화를 늦춰 황체에서 분비되는 성호르몬의 혈중농도를 높게 유지시킨다고 알려져 있다(Ilkka Y. Järvelä et al., 2008). 또한 hCG와 성호르몬 모두 유선조직의 형태학적 변화를 야기한다고 알려져 있다(Susana B. Rulli et al., 2002, Cathrin Briskin, 2013). 먼저 hCG가 성호르몬에 독립적으로 유선전구세포를 분화시켰는지 알아보기 위해 난소를 적출해 성호르몬을 제한한 처녀 마우스를 사용하였다(Figure 3A). 처녀 마우스의 난소를 적출하고 2주간 회복을 하여 혈중 성호르몬의 농도를 낮춘 뒤 hCG를 주사한 마우스와 PBS를 주사한 마우스의 유선상피세포를 유세포 분석을 통해 비교했다(Figure 3A, B). 그 결과 hCG를 주사한 마우스의 유선전구세포 비율과 PBS를 주사한 마우스의 유선상피세포 내 유선전구세포 비율에 차이가 없었다(Figure 3B, C). 온조직 염색을 통해 관찰한 결과 결가지 수 또한 차이가 없었다(Figure 3D, E). 위의 결과를 통해 hCG가 성 호르몬에 독립적으로 유선전구세포를 분화시킨다는 가설은 틀렸다고 할 수 있다.

**A****B****C****D****E**

**Figure 3. hCG는 성호르몬에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다.**

(A) 성호르몬에 독립적인 hCG의 역할을 알아보기 위한 실험모식도이다. 성체 처녀 마우스의 난소를 적출한 뒤 2주간의 회복기간을 두고 복강에 hCG를 25IU씩 또는 PBS를 250 $\mu$ l씩 4일간 주사한 후 5일째 되는 날 분석하였다.

(B) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 유세포 분석을 한 결과이다. 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 표시하였다.

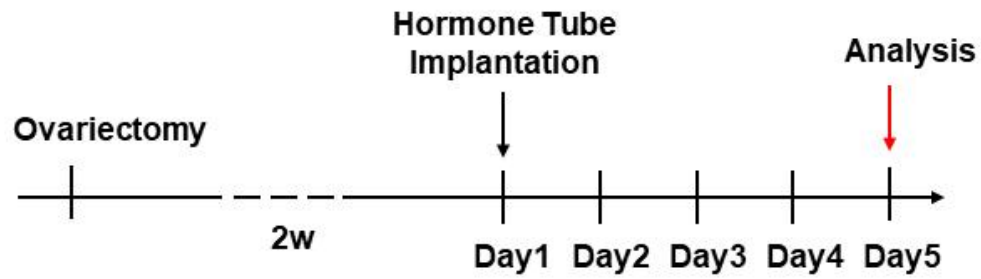
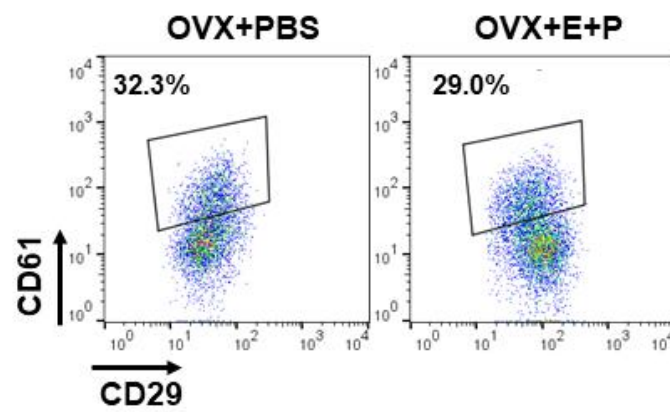
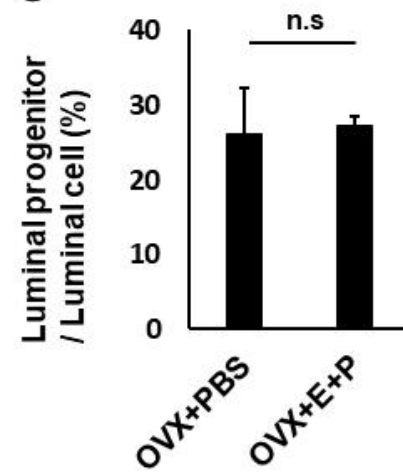
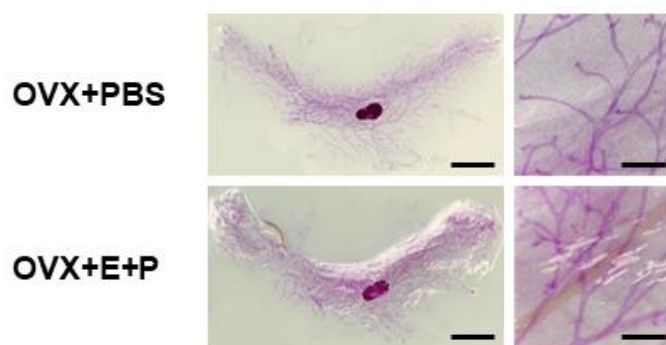
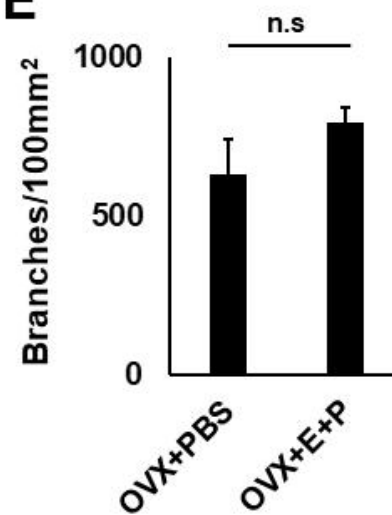
(C) (B)의 결과를 정량화한 그래프이다. 난소적출 후 hCG를 주사한 마우스와 PBS를 주사한 마우스의 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율의 차이가 없었다(n.s: P-value>0.05).

(D) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 온조직 염색을 한 결과이다(Scale bar - 왼쪽: 5000 $\mu$ m, 오른쪽: 500 $\mu$ m).

(E) (D)에서 지방체 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수를 세어 그래프로 나타내었다. 난소적출 후 hCG를 주사한 마우스와 PBS를 주사한 마우스의 유선조직 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수의 차이가 없었다(n.s: P-value>0.05).

#### V-4. 성호르몬은 hCG에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다.

V-3에서 hCG가 성호르몬에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다는 것을 확인했다. 선행연구에 따르면 hCG는 임신초기 성호르몬을 분비하는 황체의 퇴화를 늦춰 성호르몬의 혈중농도를 높게 유지시킨다고 알려져 있다(Ilkka Y. Järvelä et al., 2008). 또한 성호르몬은 유선조직의 본가지와 곁가지 형성에 중요하다고 알려져 있다(Cathrin Brisken & Bert O'Malley, 2010). 이를 토대로 성호르몬이 hCG의 하위 신호전달물질로 작용하여 유선전구세포의 분화를 유도할 것이라는 가설을 세웠다. 가설을 증명하기 위해 난소를 적출해 성호르몬의 순환을 멈추게 하고 난소에서 나올 수 있는 hCG를 제한한 처녀 마우스를 이용하였다(Figure 4A). 난소를 적출한 뒤 임신초기 황체에서 발현된다고 알려진 성호르몬( $17\beta$ -estradiol, Progesterone)이 들어있는 튜브를 이식하여 혈중 성호르몬 농도를 높인 마우스와 PBS를 주사한 마우스의 유선상피세포를 유세포 분석을 통해 비교했다(Ilkka Y. Järvelä et al., 2008)(Figure 4A, B). 그 결과 성호르몬을 투여한 마우스와 PBS를 주사한 마우스 사이에 유선전구세포 비율의 차이가 없었다(Figure 4B, C). 온조직 염색을 통해 관찰한 곁가지 수 또한 차이가 없었다(Figure 4D, E). 이와 같은 결과를 통해 성호르몬이 hCG의 하위 신호전달체계로 유선전구세포의 분화를 유도한다는 가설 또한 틀렸다고 할 수 있다.

**A****B****C****D****E**

**Figure 4. 성호르몬은 hCG에 독립적으로 유선전구세포를 분화시키지 못한다.**

(A) hCG에 독립적인 성호르몬의 역할을 알아보기 위한 실험모식도이다. 성체 처녀 마우스의 난소를 적출한 뒤 2주간의 회복기간을 두고 피하에 성호르몬 튜브(17 $\beta$ -estradiol: 75ng, progesterone: 50 $\mu$ g)를 심은 뒤 4일 뒤에 분석하였다.

(B) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 유세포 분석을 한 결과이다. 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 표시하였다.

(C) (B)의 결과를 정량화한 그래프이다. 난소적출 후 성호르몬을 투여한 마우스와 PBS를 투여한 마우스의 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율의 차이가 없었다(n.s: P-value>0.05).

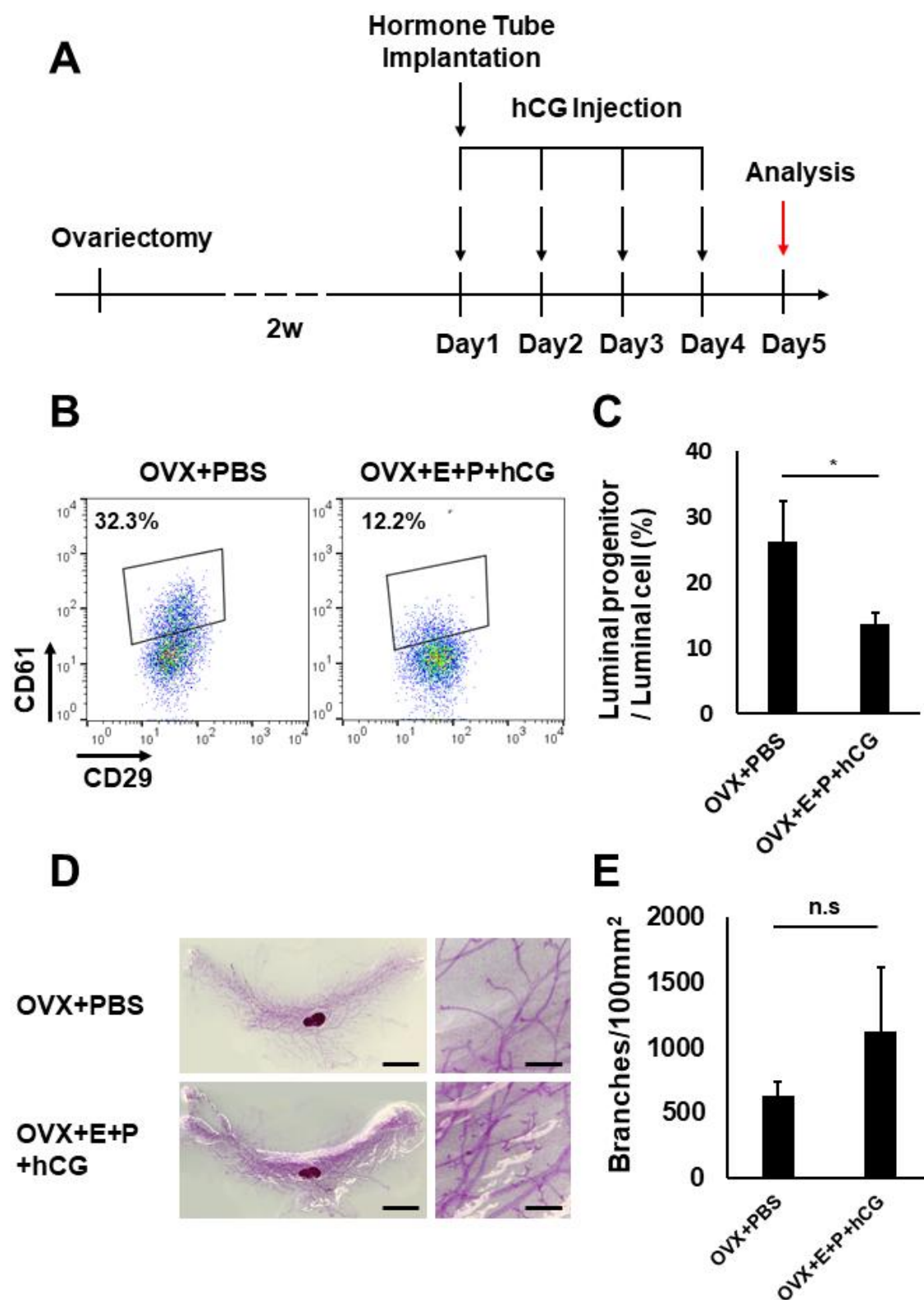
(D) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 온조직 염색을 한 결과이다(Scale bar - 왼쪽: 5000 $\mu$ m, 오른쪽: 500 $\mu$ m).

(E) (D)에서 지방체 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수를 세어 그래프로 나타내었다. 난소적출 후 성호르몬을 투여한 마우스와 PBS를 투여한 마우스의 유선조직 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수의 차이가 없었다(n.s: P-value>0.05).



#### V-5. hCG와 성호르몬이 함께 작용해 유선전구세포의 분화를 유도한다.

V-3과 V-4를 통해 임신초기 혈중농도가 늘어나는 hCG와 성호르몬 모두 단독으로 유선조직의 변화를 야기할 수 없다는 결론을 얻을 수 있었다. 그렇다면 V-2에서 확인한 hCG에 의한 유선전구세포의 분화는 hCG와 hCG에 의하여 발현이 증가한 성호르몬 단독으로 작용할 수 없고 두 호르몬이 함께 작용하여 일어났을 것이라고 가설을 세웠다. 이를 증명하기 위하여 난소를 적출한 마우스에 성호르몬이 들어있는 튜브를 이식하여 혈중 성호르몬 농도를 높이고 hCG를 주사한 마우스와 PBS를 주사한 마우스의 유선상피세포를 유세포 분석을 통해 비교했다(Figure 5A, B). 그 결과 성호르몬과 hCG를 투여한 마우스의 유선전구세포 비율이 줄어드는 것을 확인했다(Figure 5B, C). 이로써 성호르몬과 hCG가 함께 작용하여 유선전구세포를 성숙한 유선상피세포로 분화시킨다는 것을 알 수 있다(Figure 5B, C). 또한 온조직 염색을 통해 겔가지의 수를 비교한 결과 겔가지가 증가하는 경향을 보였다(Figure 5D, E)( $p>0.05$ ). 결과를 종합해보면 hCG 또는 성호르몬 단독으로 유선전구세포의 분화를 유도할 수 없고 hCG와 성호르몬이 함께 작용하여 유선전구세포의 분화를 유도한다고 할 수 있다.



**Figure 5. hCG와 성호르몬이 함께 작용해 유선전구세포의 분화를 유도한다.**

(A) hCG와 성호르몬이 함께 작용하는지 알아보기 위한 실험모식도이다. 성체 처녀 마우스의 난소를 적출한 뒤 2주간의 회복기간을 두고 피하에 성호르몬 튜브(17 $\beta$ -estradiol: 75ng, progesterone: 50 $\mu$ g)를 심고 hCG를 4일간 주사한 뒤 5일 째 되는 날 분석하였다.

(B) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 유세포 분석을 한 결과이다. 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율을 표시하였다.

(C) (B)의 결과를 정량화한 그래프이다. 난소적출 후 성호르몬과 hCG를 투여한 경우 PBS를 투여한 경우에 비해 유선상피세포 내 유선전구세포의 비율의 줄어들었다 (\*: P-value<0.05).

(D) (A)과정을 통해 얻은 유선조직으로 온조직 염색을 한 결과이다(Scale bar - 왼쪽: 5000 $\mu$ m, 오른쪽: 500 $\mu$ m).

(E) (D)의 결과에서 지방체 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수를 세어 그래프로 나타내었다. 난소적출 후 성호르몬과 hCG를 투여한 경우 PBS를 투여한 경우에 비해 유선조직 100mm<sup>2</sup>당 결가지의 수가 증가하는 경향을 보이나 통계학적으로 유의미한 차이가 없었다(n.s: P-value>0.05).

## VI. 고찰(Discussion)

기존 유선전구세포에 대한 연구는 모체유래 물질에 국한되어있다(Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007, Chakrabarti R., 2012). 본 연구는 태아유래 물질인 hCG가 유선전구세포를 분화시켜 모체 유선조직의 형태학적 변화를 유도할 수 있다는 것을 밝혔다. 나아가 모체유래 물질인 성호르몬과 태아유래 물질인 hCG가 단독으로 유선전구세포를 분화시킬 수 없으며 함께 작용하여 유선전구세포에 영향을 준다는 것을 밝혔다. hCG는 배반포의 세포영양막 뿐만 아니라 임신중반 임신후반에 걸쳐 태반에서 분비된다고 알려져 있다(Cole L. A., 2009). 또한 임신 시 유선조직과 자궁뿐만 아니라 모체의 다른 장기들에도 변화가 생긴다고 알려져 있는데(Cole L. A., 2010) 이에 대한 기작으로 모체유래 신호전달물질과 배아유래 신호전달 물질이 함께 작용할 수 있다는 가능성을 제시한다.

사춘기, 임신 등 유선조직의 형태학적인 변화가 생길 때 유선전구세포가 분화한다고 알려져 있다(Marie-Liesse Asselin-Labat et al., 2007). 형태학적인 변화가 생기려면 세포의 수가 많아져야하는데 오히려 CD61로 표지되는 유선전구세포의 비율이 줄어드는 것으로 보아 CD61로 표지되는 유선전구세포는 분열능이 좋은 또 다른 유선전구세포로 분화하여 형태학적인 변화를 일으킨다고 생각할 수 있다. 유세포 분석기계(FACS aria III)를 통해 CD61+ 유선전구세포를 분리하여 분화시킨 CD61- 유선전구세포와 CD61+ 유선전구세포, CD61- 성숙한 유선상피세포를 비교분석하면 새로운 유선전구세포의 표지자를 알아낼 수 있을 뿐만 아니라 새로운 유선전구세포의 분열을 유도하는 신호 또한 밝힐 수 있을 것이다.

유방암의 종류에는 암세포의 성질에 따라 Claudin-low, Basal, luminal A, Luminal B 네 가지가 있는데 이 중 Claudin-low를 제외한 세가지 형태의 암 모두 유선전구세포로부터 만들어질 수 있다(A Skibinski & C Kuperwasser, 2015). hCG와 성호르몬이 CD61+ 유선전구세포를 활발히 분열하는 CD61- 유선전구세포로 분화시키는 기작을 밝힌다면 유선전구세포로부터 유래된 암세포의 분열을 늦추는 항암제 개발에 도움을 줄 수 있을 것이다.

## VII. 참고문헌(References)

A Skibinski & C Kuperwasser (2015). The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*, volume 34, pages 5309 - 5316

Aino Kuorelahti, Susana Rulli, Ilpo Huhtaniemi, Matti Poutanen (2007). Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Up-Regulates wnt5b and wnt7b in the Mammary Gland, and hCG $\beta$  Transgenic Female Mice Present with Mammary Gland Tumors Exhibiting Characteristics of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation. *Endocrinology*. Volume 148, Issue 8, 1 Aug Pages 3694 - 3703.

Cathrin Briskin (2002) Hormonal Control of Alveolar Development and Its Implications for Breast Carcinogenesis, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 7, No. 1.

Cathrin Briskin (2013). Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight, *Nature Reviews Cancer* volume 13, pages 385 - 396.

Cathrin Briskin & Bert O'Malley (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2 (12), a003178. doi:10.1101/cshperspect.a003178

Chakrabarti R., Wei Y., Romano RA., DeCoste C., Kang Y., Sinha S. (2012). Elf5 regulates mammary gland stem/progenitor cell fate by influencing notch signaling. *Stem Cells*. Jul;30 (7):1496-508. doi: 10.1002/stem.1112.

Cole L. A. (2009). New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reproductive biology and endocrinology*, 7, 8. doi:10.1186/1477-7827-7-8

Daisuke Yamaji, Risu Na, Yonatan Feuermann, Susanne Pechhold, Weiping Chen, Gertraud W. Robinson and Lothar Hennighausen (2009). Development of mammary luminal progenitor cells is controlled by the transcription factor STAT5A. *Genes & Development*. doi: 10.1101/gad.1840109 23: 2382-2387.

Haibin Wang & Sudhansu K. Dey (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*. volume 7, pages 185 - 199.

Ilkka Y. Järvelä, Aimo Ruokonen, Aydin Tekay (2008). Effect of rising hCG levels on the human corpus luteum during early pregnancy. *Human Reproduction*. Volume 23, Issue 12, Pages 2775 - 2781.

Jane E. Visvader & Jone Stingl (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & development*, 28 (11), 1143 - 1158. doi:10.1101/gad.242511.114

John J. Gregory Jr and Jonathan L. Finlay (1999)  $\alpha$ -Fetoprotein and  $\beta$ -Human Chorionic Gonadotropin. *Drugs*, April, Volume 57, Issue 4, pp 463 - 467.

Kiyoshi Okuda et al. (2001) Estradiol-17 $\beta$  Is Produced in Bovine Corpus Luteum, *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 65, 1634 - 1639.

Makrigiannakis A., Vrekoussis T., Zoumakis E., Kalantaridou S.N., Jeschke U. (2017) The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (6), 1305.

Malgorzata Gajewska, Katarzyna Zielniok and Tomasz Motyl (2013). Autophagy in Development and Remodelling of Mammary Gland. DOI: 10.5772/54558.

Marie-Liesse Asselin-Labat, Kate D. Sutherland, Holly Barker, Richard Thomas, Mark Shackleton, Natasha C. Forrest, Lynne Hartley, Lorraine Robb, Frank G. Grosveld, Jacqueline van der Wees, Geoffrey J. Lindeman and Jane E. Visvader (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biology*. DOI:10.1038/ncb1530

Paine, I. S., & Lewis, M. T. (2017). The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 22 (2), 93 - 108. doi:10.1007/s10911-017-9372-0

Russo IH1, Koszalka M, Russo J. (1990). Effect of human chorionic gonadotropin on mammary gland differentiation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* Oct;11 (10):1849-55.

Scheele, C.L., Hannezo, E., Muraro, M.J., Zomer, A., Langedijk, N.S., van Oudenaarden, A., Simons, B.D., and van Rheenen, J. (2017). Identity and dynamics of mammary stem cells during branching morphogenesis. *Nature* volume 542, pages 313 - 317.

Susana B. Rulli, Aino Kuorelahti, Öznur Karaer, Lauri J. Pelliniemi, Matti Poutanen, Ilpo Huhtaniemi, Reproductive Disturbances, Pituitary Lactotrope Adenomas, and Mammary Gland Tumors in Transgenic Female Mice Producing High Levels of Human Chorionic Gonadotropin. *Endocrinology*, Volume 143, Issue 10, 1 October 2002, Pages 4084 - 4095.

## VIII. Abstract in English (영문초록)

### Studies of hCG on mammary gland at early pregnancy

Wonbin Lee

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Mammary gland is morphologically and functionally incomplete at birth and develop after puberty. Mammary gland is surrounded by a fat pad and has primary ducts connected directly to the nipple and side branches extending from primary ducts. In early pregnancy, the number of side branches increases to widen the space in which milk producing lobulo-alveolars are made. Lobulo-alveolars are made in middle of pregnancy and alveolar epithelial cells present in lobulo-alveolars differentiate and secrete milk at the end of pregnancy. Both primary ducts and side branches are composed of two layer of cells surrounding ducts which inner layer is composed of luminal epithelial cells and outer layer is composed of myo-epithelial cells. To maintain mammary gland, mammary stem cells (MaSC) differentiate into luminal progenitor cells and myo-epithelial progenitor cells that become luminal epithelial cells and myo-epithelial cells each. Luminal progenitor cells are located in side branches and differentiation into ductal epithelial cells which retain the shape of duct and alveolar epithelial cells which secrete milk at pregnancy. When milk producing is not need anymore, mature luminal epithelial cells which are made for milk secretion, undergo apoptosis and lobulo-alveolars are disappear.

Secretion of milk affects the viability of the fetus rather than the mother. It is



thought that the differentiation mechanism of the Luminal progenitor cells, which actively divide and differentiate only during the secretion period of milk for the survival of the fetus, is influenced by the embryo - derived substances, but previous studies are limited to maternal-derived substances such as Elf5, Gata-3, and Stat5. In this paper, I have identified the timing of differentiation of Luminal progenitor cells in early pregnancy and found that hCG, which is known to be derived from the embryo at this time, induces differentiation of Luminal progenitor cells and induces side branch formation. Although hCG is known to be involved in the development of mammary gland tissue, sex hormones that are expressed by hCG are also known to be involved in the development of mammary gland. In this paper, I have shown that hCG and sex hormones must work together to induce differentiation of luminal progenitor cells.

Keywords: Luminal progenitor cells, hCG, Sex hormone, Side branch, Pregnant

Student number: 2016-29780